

• 临床医学 •

## 大肠癌胃泌素 mRNA 表达的临床研究

方 胜<sup>1</sup> 吴 佩<sup>1</sup> 刘永忠<sup>2</sup> 杨本海<sup>2</sup> 夏祥厚<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究胃泌素(gastrin, GAS) mRNA 在大肠癌组织、近旁粘膜(距癌组织 < 3 cm)、远旁粘膜(距癌组织 > 8 cm)的表达变化及与临床病理参数的关系。方法 收集手术切除的大肠癌新鲜标本 50 例,分别取癌组织、近旁粘膜和远旁粘膜,匀浆提取 RNA,逆转录巢式 PCR 扩增检测 GAS mRNA 表达情况。结果 GAS mRNA 阳性表达率:癌组织高于近旁粘膜( $P < 0.01$ ),近旁粘膜高于远旁粘膜( $P < 0.05$ );低分化癌较高、中分化癌为高( $P < 0.01$ );C、D 期较 A、B 期为高( $P < 0.01$ );粘液腺癌、印戒细胞癌、未分化癌较乳头状腺癌、管状腺癌为高( $P < 0.05$ )。结论 大肠癌细胞或组织自身分泌 GAS,调节大肠癌的生长;GAS 的表达变化是大肠癌发病原因之一;GAS mRNA 的表达与大肠癌的分化程度、临床分期、病理类型关系密切。

**关键词** 结肠直肠癌;胃泌素类;RNA,信使;逆转录聚合酶链反应

中图分类号 R 735.35

文献标识码 A 文章编号 1002-0217(2002)01-0020-04

大肠癌是常见的恶性肿瘤之一,在经济发展国家发病率高,近年来在我国其发病率呈上升趋势。大肠癌与胃肠激素的关系,以及大肠癌的内分泌的治疗,越来越受到国内外学者的关注。目前,国内研究胃肠激素与大肠癌的关系多局限在细胞蛋白表达水平,尽管免疫组化、放免法、免疫电泳等能检测到大肠癌细胞中胃肠激素的存在,但尚不能区分是大肠癌细胞自身分泌,还是来自于血液中胃肠激素的贮存。本研究采用逆转录巢式 PCR 方法从分子水平研究大肠癌与胃肠激素的表达关系,分析 GAS mRNA 在癌组织、近旁粘膜和远旁粘膜中的表达变化,探讨与其分化程度、临床分期和病理类型的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 收集我院 1999 年 8 月至 2000 年 11 月大肠癌手术切除新鲜标本 50 例:直肠癌 35 例,结肠癌 15 例;年龄 25~76 岁,平均年龄( $52.8 \pm 11.5$ )岁;男性 33 例,女性 17 例,每例手术切除标本取癌组织、癌近旁粘膜(CAM,距肿瘤 < 3 cm)和癌远旁粘膜(CDM,距肿瘤 > 8 cm)各 2 块。匀浆提取 mRNA 后, - 70℃ 保存备用。组织类型按全国大肠癌协作组诊断标准:高分化癌(乳头状腺癌、和管状腺癌 I)17 例,中分化癌(管状腺癌 II、粘液腺癌)18 例,低分化癌(管状腺癌 III、印戒细胞癌和未分化

癌)15 例,组织学类型:乳头状腺癌 14 例,管状腺癌 20 例,粘液腺癌 5 例、印戒细胞癌 5 例和未分化腺癌 6 例;Dukes 分期:A 期 10 例,B 期 14 例,C 期 18 例,D 期 8 例。

**1.2 主要试剂** 逆转录试剂盒,SK 312,Trizol 试剂,Taq 聚合酶,Marker, dNTP 均由上海生工公司提供。胃泌素 mRNA 扩增引物参见文献[1],由上海生工公司合成。引物 1:5' TATGTGCTGATCTTTGCACTGGCT3' (sense: 6307-6330),引物 2:5' CTCATCCTCAGCACTGCGGCGGCC3' (antisense: 6718-6695),引物 3:5' GAGCTACCTGGCTGGAGCAGCAG3' (sense: 6415-6438)。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 RNA 提取** 收集手术切除的大肠癌组织及其癌近旁粘膜组织,严格避免互相污染。取约 0.1 g 组织标本,剪刀剪碎,移入匀浆器,加入 1 ml Trizol 试剂,匀浆。匀浆样本 15~30℃ 放置 5 min,使蛋白复合体完全分解。每 1 ml 匀浆液加入 0.2 ml 氯仿。用手剧烈震荡 15 s,15~30℃ 放置 2~3 min。4℃ 离心,8000 r/min,15 min。试管中呈现 3 个液相,下层酚氯仿相,上层水相,中间界面相。小心吸取上层水相(含绝大多数 RNA)移至另一 EP 管中,沉淀。向水相中加入异丙醇 0.5 ml,15~30℃ 放置 10 min,4℃。管底可见白絮状沉淀。小心弃去上清,加入 75%乙醇 1 ml,涡旋 5 s,4℃ 离心 7500 r/min 5 min。弃上清,真空干燥,加 50  $\mu$ l 无 RNase 水,55℃ 水浴 10 min,充分溶解 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 浓度。提取总 RNA 置于 - 70℃ 保存备用。

**1.3.2 mRNA 的逆转录** 取约 5  $\mu$ g RNA,75%乙

收稿日期:2001-07-15

作者单位:1 附属弋矶山医院普外科 241001

2 临床医学研究所

作者简介:方 胜,男,1974 年生,98 级普外科学研究生,住院医师,现在安庆市海军 116 医院普外科 246001

吴 佩,男,1957 年生,教授,主任医师,硕士生导师

醇洗涤,低速涡旋,使沉淀松解, < 7500r/min, 4 ℃ 离心 5 min. 小心倾去上清. 真空抽干,使 RNA 干燥,加入寡聚胸腺嘧啶(0.5 μg/ μl)1 μl,加去离子水至 12 μl. 离心机轻轻混匀振荡 35 s. 70 ℃温浴 5 min,置冰上冷却,短暂离心. 置试管于冰上,依次加入下列成份:5 × 缓冲液 4 μl;RNA 酶抑制剂(20 U/ μl)1 μl;10 mmol dNTPmix 2 μl. 轻轻混匀,稍离心后收集. 37 ℃温浴 5 min,加入鼠白血病逆转录酶(20 U/ μl)1 μl. 37 ℃温浴 60 min,70 ℃加热 10 min,冰上冷却.

1.3.3 第 1 轮 PCR 总反应体系为 25 μl,cDNA 2.5 μl,Taq DNA 聚合酶 1 U,加入引物 1、引物 2,94 ℃初始变性 5 min 后,按 94 ℃30 s,60 ℃45 s,72 ℃45 s 反应,在 Perkin Elmer 480 扩增仪上进行 30 个循环扩增,最后延伸 6 min. 以 5 × 缓冲液 2.5 μl 代替 cDNA 作为空白对照,其他反应条件和参数不变.

1.3.4 第 2 轮 PCR 除引物换为引物 2、引物 3 外,其它反应条件和参数不变.

1.3.5 PCR 产物分析 取 6 μl 扩增产物在 5 % 的聚丙烯酰胺凝胶电泳. 取下聚丙烯酰胺凝胶,10 % 乙醇,5 % 冰乙酸固定 20 min. 蒸馏水冲洗,0.2 % AgNO<sub>3</sub> 染色 30 min. 2.5 % 碳酸钠,0.04 % 甲醛溶液显色,10 % 冰乙酸停止显像. 观察结果,照像.

1.4 统计学处理 大肠癌 GAS mRNA 阳性表达率各组间比较采用  $\chi^2$  检验和精确概率法检验.

## 2 结果

2.1 PCR 扩增最终产物 胃泌素 mRNA 逆转录巢式 PCR 扩增最终产物见图 1. 胃泌素 PCR 扩增最终产物为 174bp.

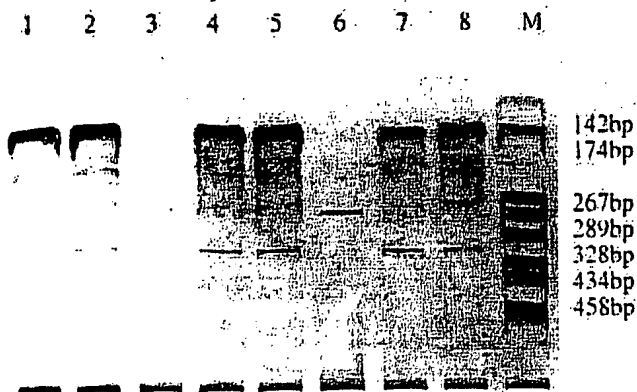


图 1 胃泌素 mRNA 逆转录巢式 PCR 扩增最终产物在聚丙烯酰胺凝胶中电泳后银染照相结果

2.2 GAS mRNA 在大肠癌组织、近旁粘膜及远旁粘膜中的表达 GAS mRNA 在大肠癌组织中阳性表达 22 例,近旁粘膜中有 8 例阳性表达,远旁粘膜中未见表达,如表 1.

表 1 癌组织 近旁粘膜 远旁粘膜中 GAS mRNA 阳性表达率

组织	例数	GAS( %)
癌组织	50	44.0
近旁粘膜	50	16.0
远旁粘膜	50	0.0

•  $P < 0.01$ :与癌组织比较; • •  $P < 0.05$ :与近旁粘膜比较

2.3 GAS mRNA 表达与临床病理参数之间的关系

GAS mRNA 在大肠癌不同分化程度、Dukes 分期、病理类型中阳性表达率,如表 2 所示.

表 2 大肠癌不同分化程度、Dukes 分期、病理类型中

GAS mRNA 阳性表达率

组织	例数	GAS( %)
分化程度		
高分化癌	17	5.9
中分化癌	18	38.9
低分化癌	15	93.3
Dukes 分期		
A、B 期	24	25.0
C、D 期	26	61.5
病理类型		
乳头状腺癌	14	7.1 <sup>Δ</sup>
管状腺癌	20	35.0 <sup>ΔΔ</sup>
粘液腺癌	5	100.0
印戒细胞癌	5	80.0
未分化癌	6	83.3

•  $P < 0.01$ :与高分化癌、低分化癌比较; • •  $P < 0.01$ :与 A、B 期比较;  $\Delta P < 0.01$ :与粘液腺癌、印戒细胞癌、未分化癌比较;  $\Delta\Delta P < 0.05$ :与粘液腺癌、印戒细胞癌、未分化癌比较.

## 3 讨论

3.1 大肠癌胃泌素的自分泌机制 胃泌素是一种多肽激素,主要由胃肠道 G 细胞分泌的前胃泌素原水解而产生,常见有 G17、G14、G34、G50,它的主要生理功能是促进胃壁细胞释放以及营养胃肠粘膜. 因与胆囊收缩素在结构上具有共同的 C 端五肽酰胺而同属胃泌素族. 三分之二的 G 细胞位于胃窦部,产生的胃泌素 90 % 为 G17,其余 G 细胞位于十二指肠和空肠,而结直肠粘膜中未发现有 G 细胞. 多数研究表明,胃肠激素不仅广泛存在于胃肠道、中枢神经系统中,而且存在于一些消化道肿瘤如大肠癌、胰腺癌、胃癌等中<sup>[2]</sup>,一些大肠癌可通过自分泌

方式分泌胃肠激素,而癌细胞又表达该激素受体,前者通过后者调节大肠癌的生长。本实验结果表明,50 例大肠癌癌组织中 22 例胃泌素 mRNA 阳性表达,进一步证实了部分大肠癌细胞自身能分泌 GAS,通过自分泌和旁分泌调节大肠癌的生长。大肠癌具有自分泌功能,其机制尚不明确,目前主要有两种理论:①细胞杂交理论,即肿瘤上皮细胞与 APUD 细胞杂交形成混合细胞成分的肿瘤。②内胚层来源。肿瘤来源于多潜能干细胞,有一些在正常分化过程中被封闭的基因,则在肿瘤形成过程中被活化,出现基因的异常表达,肿瘤组织中就可能有多向分化的神经内分泌细胞。有文献报道 GAS 在大肠癌中的表达与 TGF、EGF<sup>[3]</sup>以及 bcl-2 蛋白<sup>[4]</sup>、Ras 癌基因等诱导有关。本文结果显示 GAS 的表达与肿瘤分化密切相关,与 APUD 细胞分泌特点不同,似乎更支持内胚层来源理论。

有文献报道,肿瘤细胞的胃泌素 mRNA 所编码的 GAS 并不是酰胺化 GAS,而是胃泌素前体,且肿瘤恶性程度越高,胃泌素前体的比例越高<sup>[5]</sup>。但肿瘤细胞内的 GAS 基因与正常粘膜的 GAS 基因完全相同,肿瘤细胞未能表达成熟的胃泌素,可能为肿瘤细胞内肽加工酶的活性或表达发生改变有关,或是一种胚胎方式的重现<sup>[6]</sup>。酰胺化的 GAS 及 GAS 前体通过不同的细胞内途径刺激肿瘤细胞的增生。但也有研究认为,酰胺化 GAS 与甘氨酸 GAS 均可作用于 GAS 受体,促进大肠癌 LOVO 细胞的生长<sup>[7]</sup>。

3.2 GAS 表达与大肠癌的发生 研究表明,大肠癌中 GAS 基因表达与肿瘤发病有关<sup>[8]</sup>。本文结果表明,GAS 表达在大肠癌癌组织、近旁粘膜和远旁粘膜中有明显差异,癌组织 mRNA 阳性表达率高于近旁粘膜、远旁粘膜,故可认为胃泌素的基因表达与大肠癌的发生相关,可能是大肠癌发生原因之一。一般认为,GAS 促进大肠粘膜的过度增生而导致大肠癌的发生。D'Agostino<sup>[9]</sup>发现经氮甲烷(AOM)诱发的结肠癌实验动物,在其高 GAS 血症的肿瘤组织中,鸟氨酸脱羧酶(ODC)活性增高,提示 GAS 增加 ODC 活性,细胞内多肽含量升高使结肠粘膜过度增生而发生癌变,这些研究为 GAS 促进结肠癌发生提供了间接依据。另外 GAS 还可通过与受体结合激活膜上磷脂酶 C<sup>[10]</sup>或增加细胞内 cAMP 水平<sup>[11]</sup>,发挥调节细胞生长与分化。但也有资料表明,长期或短期的质子泵抑制剂的运用所引起的高 GAS 血症,并不导致大肠癌发病率升高<sup>[12]</sup>。分析其原因可能为大肠癌的发生中 GAS 并不是一个独立因素。

### 3.3 GAS 的表达与大肠癌的临床病理参数的关系

文献报道,胃泌素的蛋白表达与大肠癌的病理类型、分化程度和临床分期关系密切,分化程度低 GAS 表达高,随着肿瘤病期发展,胃泌素阳性表达率明显上升。大肠癌中粘液腺癌、印戒细胞癌、未分化癌 GAS 阳性表达率明显高于其它类型大肠癌<sup>[13]</sup>。本文 RT-PCR 结果显示,GAS mRNA 阳性表达率在不同病理类型、分化程度、不同病期中的差异,进一步揭示了大肠癌在分子水平上表达 GAS 的特点。GAS 的表达之所以与大肠癌病理类型、分化程度关系密切,可能是由于分化不良的癌细胞封闭基因稳定性差,易于出现内分泌分化,故一般在正常大肠粘膜中不表达的胃泌素在低分化大肠癌中表达率高。GAS 随大肠癌病期进展而表达增高,可能是肿瘤在不断生长过程中,受到机体抵抗力、免疫力的不断选择而变得越来越具有侵袭性。

李家琪等测定大肠癌组织中胃泌素水平时也发现,在各组织学类型中,癌组织内 GAS 水平随细胞分化程度降低有逐渐升高的趋势,但未能发现癌组织中 GAS 水平随临床分期的变化。尽管各家报道不尽一致,但多认为大肠癌中 GAS 的表达与临床病理参数之间关系密切。本文从 mRNA 水平进一步证实了这方面的联系。

### 参考文献

- 1 Monges G, Biagini P, Cantaloube JF, et al. Gastrointestinal hormone mRNA expression in human colonic adenocarcinomas, hepatic metastase and cell lines. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 1996; 49: M159
- 2 Ciccotosto GD, Mcleish A, Hardy KJ, et al. Expression, processing and secretion of gastrin in patient with colorectal carcinoma. *Gastroenterology*, 1995; 109: 1142
- 3 Howell GM, Ziober BL, Humphrey LE, et al. Regulation of autocrine gastrin expression by the TGF alpha autocrine loop. *J Cell Physiol*, 1995; 162(2): 256
- 4 Ohmori T, Asahi S, Sato C, et al. Bcl-2 protein expression and gut neurohormonal polypeptide/amine production in colorectal carcinomas and tumor neighboring mucosa, which closely correlate to the occurrence of tumor. *Histol histopathol*, 1999; 14(1): 37
- 5 Singh P, Xu Z, Dai B, et al. Incomplete processing of progastrin expression by human colon cancer cells: role of noncarboxamidated gastrins. *Am J Physiol*, 1994; 266(3pt1): G459
- 6 Van Solinge WW, Nielsen FC, Friis-Hansen L, et al. Expression by incomplete maturation of progastrin in colorectal carcinoma. *Gastroenterol*, 1993; 104(4): 1099
- 7 Artru P, Attoub S, Levasseur S, et al. Gastrin-17 and Gl 7- Gly induce proliferation of LOVO cells through the CCK B / gastrin receptor. *Gastroenterol Clin Biol*, 1998; 22(6-7): 607
- 8 Xu Z, Dai B, Dhruva B, et al. Gastrin gene expression in human colon cancer cells measured by a single competitive PCR method. *Life Sci*, 1994; 54(10): 671
- 9 D'Agostino L, Pignata S, Tritto G, et al. Hypergastrinemia in rats with azoxymethane-induced colon cancers. *Int J Cancer*, 1995; 61(2): 223

- 10 Ishizuka J, Townsend CM Jr, Bold RT, et al. Effects of gastrin on 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate, intracellular calcium, and phosphatidylinositol hydrolysis in human colon cancer cells. *Cancer Res*, 1994;54(8):2129
- 11 Bold RJ, Alpard S, Ishizuka J, et al. Growth regulatory effect of gastrin on human colon cancer cell lines is determined by protein kinase a isoform content. *Regul Pept*, 1994;53(1):61
- 12 Garmett WR. Considerations for long term use of proton pump inhibitors. *Am J Health Sust Pharm*, 1998;55(21):2268
- 13 吴佩,芮景,夏祥厚,等. 大肠癌胃泌素、生长抑素的表达及其比势研究. *中华实验外科杂志*, 1998;15(6):520
- 14 李家琪,何双梧,李益仁,等. 大肠癌病人血清及癌组织中胃泌素水平测定及其临床意义. *中华消化外科杂志*, 1997;17(1):36

## Clinical Investigation of Expression of Gastrin mRNA in Colorectal Carcinoma

Fang Sheng, Wu Pei, Liu Yongzhong, et al

(Dept of General Surgery, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001)

**Abstract** *Objective* To investigate the expression of gastrin (GAS) mRNA in cancer tissues, cancer-adjacent mucosa (CAM) and cancer distant mucosa (CDM) of colorectal carcinoma, and its relation to histological type, cell differentiation and clinicopathological stage. *Methods* The fresh specimens were collected from 50 cases of colorectal carcinoma excised, which include cancer tissues, CAM and CDM. After extraction and reverse transcription, gastrin mRNA were detected by using nested PCR with specific primers. *Results* The percentage of GAS mRNA expression in cancer tissues is higher than that in CAM and CDM, higher in poorly differentiated carcinoma than in well differentiated carcinoma, higher in Dukes C, D stages than in Dukes A, B stages, and higher in mucoid adenocarcinoma, signet-ring cell carcinoma and undifferentiated carcinoma than in papillary adenocarcinoma and tubular adenocarcinoma. *Conclusion* Colorectal carcinoma expresses GAS to regulate its growth for itself. The change of GAS expression in colorectal carcinoma is one of the pathogenic causes of colorectal carcinoma. The expression of GAS is related closely to histological type, cell differentiation and clinicopathological stage.

**Key words** colorectal neoplasms; gastrin; RNA, messenger; reverse transcriptase polymerase chain reaction

• 学位论文摘要 •

### 胃脘痛的时间节律研究

#### 附 1844 例临床调查及胃痛灵汤对胃肠道作用的时间节律实验研究

98 级中医基础理论专业研究生 石建喜 导师 李济仁

**目的** 研究胃脘痛病理的时间节律性,探讨其形成机制和临床意义。**方法** 采用临床流行病学调查方法,对 1844 例胃脘痛患者进行了调查分析,并结合动物实验及文献研究。**结果** 胃脘痛患者起病和发作、加重存在时间节律。年节律:起病多出现于冬、春季(12~2月);加重多见于秋、冬季(8~12月);昼夜节律:夜间为高发时段,尤其是子时(23~1时);太阴月节律:上半月(10~15日)为发病高峰。正常小鼠的皮肤痛阈、血清 SOD 血清、胃组织 MDA 存在昼夜节律:峰值均在暗期后段(1~6时),明期相对较低。胃痛灵汤对消炎痛致小鼠胃粘膜损伤具有显著的镇痛和抗胃粘膜损伤作用,可明显提高小鼠胃组织、血清 SOD 含量,降低 MDA 含量,并可调整其时间节律。**结论** 胃脘痛存在多种时间节律,主要与外在刺激因素有关,与中枢神经系统的痛觉敏感性无关;镇痛和抗胃粘膜损伤作用可能是胃痛灵汤治疗胃脘痛的药理基础。

**关键词** 胃脘痛;时间节律;小鼠;胃痛灵汤;SOD;MDA